

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
2015-YL-049**

**EGE BÖLGESİ KIRAZ ALANLARINDA *Leucostoma* spp.
İZOLATLARININ VİRÜLENSLİK ve dsRNA VARLIĞI
YÖNÜNDEN İNCELENMESİ**




Melis TÖNGÜŞLÜ

**Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ**

AYDIN

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bitki Koruma Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Melis TÖNGÜŞLÜ tarafından hazırlanan “Ege Bölgesi Kiraz Alanlarında *Leucostoma* spp. İzolatlarının Virülenslik ve dsRNA Varlığı Yönünden İncelenmesi” başlıklı tez, 11/08/2015 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan : Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ	ADÜ	
Üye : Doç. Dr. Himmet TEZCAN	UÜ	
Üye : Doç. Dr. Ömer ERİNCİK	ADÜ	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans Tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Aydın ÜNAY

Enstitü Müdürü

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

11/08/2015

Melis TÖNGÜŞLÜ

ÖZET

EGE BÖLGESİ KIRAZ ALANLARINDA *Leucostoma* spp. İZOLATLARININ VİRÜLENSLİK ve dsRNA VARLIĞI YÖNÜNDEN İNCELENMESİ

Melis TÖNGÜŞLÜ

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ

2015, 35 sayfa

Leucostoma (Cytospora) Dal Kanseri kiraz ağaçlarında kısmen ya da bütününde kurumalara neden olan önemli hastalıklardan biridir. Ülkemizin farklı bölgelerinde yapılan çalışmalarda çeşitli taş çekirdekli meyve türleri üzerinde *Leucostoma* kanserinin varlığı belirlenmiştir. 1989 yılında ABD Michigan eyaletinde şeftali bahçelerinde bazı *L. personii* populasyonları içerisinde dsRNA içeren 2 izolatın varlığı saptanmıştır. Ülkemizde ise *Leucostoma* türlerinin dsRNA varlığı ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma Ege Bölgesi kiraz alanlarında *Leucostoma* türlerinde dsRNA içeren izolatların belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla Ege Bölgesinde en fazla kiraz üretimi yapılan alanlardaki ağaçlardan elde edilmiş *Leucostoma* spp. izolatları dal testi ve elma testi uygulanarak virülenslik açısından değerlendirilmiştir. Bu testlere göre düşük ve yüksek virülenslik gösteren 26 izolat seçilmiş ve dsRNA analizi üç tekrarlı olarak yapılmış ve sadece 6 izolatta dsRNA profili belirlenmiştir. Fakat ikinci yinelemede bu izolatlardan sadece 3 tanesinde dsRNA profili görülmüş, üçüncü tekrarda ise daha önce dsRNA profili belirlenen izolatların hiçbirinde dsRNA profiline rastlanmamıştır. Birbirini doğrulamayan bu sonuçlar işlemler sırasındaki kurumalardan ve donma-çözünmelerden kaynaklanabileceği için daha detaylı çalışmaların yapılması önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Leucostoma* kanseri, *Leucostoma* spp., Kiraz, dsRNA

ABSTRACT

INVESTIGATION OF VIRULENCE AND PRESENCE OF dsRNA ON *Leucostoma* spp. ISOLATES IN THE CHERRY PRODUCTION AREAS OF THE AEGEAN REGION

Melis TÖNGÜŞLÜ

M.Sc. Thesis, Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ

2015, 35 pages

Leucostoma (Cytospora) canker, economically important disease of cherry, causes the tree to die partially or completely. In studies conducted in different regions of our country is determined the presence of *Leucostoma* cancer on various stone fruit species. In studies in the United States the presence of dsRNA containing 2 isolates were detected in some *L. personii* populations. No study has been previously conducted in details on *Leucostoma* species presence of dsRNA isolates in Turkey. This study was conducted to determine *Leucostoma* species of the containing dsRNA isolates in the Aegean Region cherry field. This purpose in the Aegean region maximum cherry production made derived from trees in the area and *Leucostoma* spp. isolates possible dsRNA may be isolates applied to branches test and apples test was evaluated in terms of virulence. These test according to selected 26 isolates and dsRNA analysis was performed in three repeat and only identified dsRNA profile in 6 isolates. But at second repeat identified dsRNA profile only 3 isolates, third of these isolates dsRNA profile could not be seen again. These results confirm each other that during the process to be due to drying, freezing-thawing construction of a more detailed study is suggested.

Key Words: *Leucostoma* canker, *Leucostoma* spp., Cherry, dsRNA

ÖNSÖZ

Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından (ZRF-14025 numaralı proje) desteklenen araştırmamız, ülkemizde ve dünyada kiraz üretimi açısından önemli paya sahip kiraz ağaçlarından elde edilen *Leucostoma* spp. izolatlarında elma ve dal testi uygulanarak seçilen izolatların içerisinde dsRNA olup olmadığının tespitine yönelik olarak yapılmıştır.

Çalışmamda bana yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ' e,

Tezimin *Leucostoma* spp. ile ilgili tüm aşamalarında benden yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Ömer ERİNCİK ve Zir. Yük. Müh. Ethem YILMAZ' a

Kiraz dal materyali temini için Honaz İlçe Tarım Müdürlüğü ve Denizli Birlik Meyvecilik A.Ş. çalışanlarına,

Bana tezim boyunca maddi ve manevi destek olan başta AİLEM olmak üzere, Araş. Gör. Sevdije YORGANCI' ya, Zir. Yük. Müh. Gülçin SÜMER' e, Sayın Hocam Yrd. Doç. Dr. Zahide ÖZDEMİR' e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI.....	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	8
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	12
3.1. Materyal	12
3.2. Yöntem.....	12
3.2.1. Virülenslik Testleri.....	12
3.2.1.1. Kesik dal testi.....	12
3.2.1.2. Elma meyvesi üzerinde virülenslik testi.....	14
3.2.1.3. dsRNA analizi	15
3.2.1.4. Total RNA izolasyonu.....	17
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	19
4.1. Virülenslik Testleri	19
4.1.1. Kesik Dal Testi	19
4.1.2. Elma Testi	22
4.1.3. dsRNA Analizi	26
5. SONUÇ	30
KAYNAKLAR	31
ÖZGEÇMİŞ.....	35

SİMGELER DİZİNİ

FAO	: Food Agriculture Organization
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
μ L	: Mikrolitre
gr	: Gram

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 3.1. *Leucostoma* spp. izolatlarının kesilmiş kiraz dalları üzerindeki patajonisite testleri; a) Dallara yara açma işlemi b) İnoküle edilen dalların iklim odasında inkübasyonu 13
- Şekil 3.2 *Leucostoma* spp. izolatlarının elma üzerindeki patajonisite testleri; a) *Leucostoma* izolatının elma üzerindeki yara içerisine yerleştirilmesi b) İnoküle edilen elmaların iklim odasında inkübasyonu 14
- Şekil 3.3. PDA üzerinde gelişen 4 günlük *Leucostoma* spp. izolatları 15
- Şekil 3.4. *Leucostoma* spp. izolatlarının dsRNA analizi a) Fungus miselyalinin ezildikten sonraki hali b) CF II cellulose kolon kromotografisi 16
- Şekil 3.5. *Leucostoma* spp. izolatlarının total RNA izolasyonu aşamaları a) Miropipet ile örneklerin epondorfa aktarımı b) Örneklerin elektroforeze yükleme işlemi 18
- Şekil 4.1. *Leucostoma* spp. izolatlarının Napolyon kiraz çeşidinde oluşturdukları lezyonlar a) Lezyon gelişmeyen (Ki-301A) b) Düşük virülenslik (Ki-52) c) Orta virülenslik gösteren (Ki-166A) d) Yüksek virülens olan (Ki-359) dallar 21
- Şekil 4.2. *Leucostoma* spp. izolatlarının Granny Smith elma çeşidinin meyveler üzerinde oluşturdukları farklı boyutlardaki lezyonlar 22
- Şekil 4.3. *Leucostoma* spp. izolatlarından elde edilen dsRNA' ların agar jel elektroforez görüntüsü; Marker (M), USA-2 (1), Ki-394 (2), Ki-376 (3), Ki-280 (4), Ki-407 (5), Ki-301A (6) 27
- Şekil 4.4. *Leucostoma* spp. izolatlarından elde edilen dsRNA' ların agar jel elektroforez görüntüsü; Marker (M), USA-2 (1), Ki-778 pik. (2), Ki-451 (3), Ki-52 (4), Ki-236 (5), Ki-271 (6) 27
- Şekil 4.5. *Leucostoma* spp. izolatlarından elde edilen dsRNA' ların agar jel elektroforez görüntüsü; Marker (M), USA-2 (1), Ki-778 pik. (2), Ki-199 (3), Ki-125 (4), Ki-220A (5), Ki-239 (6) 28
- Şekil 4.6. *Leucostoma* spp. izolatlarından elde edilen Total RNA' ların elektroforez görüntüsü; Marker (M), USA-2 (1), Ki-778 pik.(2), Ki-301-A (3), Ki-52 (4), Ki-376 (5), Ki-280 (6), Ki-778 pik. (7), Ki-407 (8), M-16 (9), USA-2 (10) 29

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Dünyada kiraz üreticisi ülkelerin kiraz üretim alanları ve üretim miktarı	2
Çizelge 1.2. 2003-2014 yılları arasında Türkiye’ de kiraz üretim alanı ve miktarı	3
Çizelge 1.3. Türkiye’ de bölgelere göre kiraz üretim alanları ve miktarları	4
Çizelge 1.4. Ege Bölgesi illerinde kiraz üretim alanı, ağaç sayıları, üretim ve verim miktarları	5
Çizelge 4.1. <i>Leucostoma</i> spp. izolatlarının ‘Napolyon’ kiraz çeşidi dalları üzerinde oluşturdukları lezyon büyüklüklerine göre gruplandırılması	20
Çizelge 4.2. Kesilmiş dal testinde SPSS analizine göre izolatların gruplandırılması	20
Çizelge 4.3. <i>Leucostoma</i> spp. izolatlarının elma üzerinde 5. günde oluşturdukları lezyon büyüklüklerine göre gruplandırılması	23
Çizelge 4.4. <i>Leucostoma</i> spp. izolatlarının elma üzerinde 10. günde oluşturdukları lezyon büyüklüklerine göre gruplandırılması	24
Çizelge 4.5. Elma testinde SPSS analizine göre izolatların gruplandırılması	25

1. GİRİŞ

Kiraz (*Prunus avium*), gülgiller (*Roseaceae*) familyasından Giresun, Güney Kafkasya, Hazar Denizi ve Kuzeydoğu Anadolu' da doğal olarak bulunan meyve ağacıdır. Kiraz dünyada geniş bir yayılım göstermektedir. Ancak ticari üretimi Türkiye, ABD, İran ve İtalya gibi ülkelerde yapılmaktadır. Yıllara ve iklim şartlarına göre değişmekle beraber dünya kiraz üretiminde birinci sırada yer alan Türkiye, kiraz ihracatında da söz sahibi olan ülkelerden biridir. (Anonim, 2014a).

Ülkemizde Nisan sonu ile Temmuz arasında olgunlaşan kirazın taze meyve olarak tüketilmesinin yanı sıra kurutulularak, tatlı yapımında ve içeceklerde kullanım alanı bulunmaktadır. Kiraz meyvesinin içerisinde 100 gr taze kiraz meyvesinin içerdiği besin değerinde 70 kalori; 1,3 gr protein; 17,5 gr karbonhidrat; 0,3 gr yağ; 0,4 gr lif; 19 mg fosfor; 22 mg kalsiyum; 0,4 mg demir; 2 mg sodyum; 191 mg potasyum; 110 IU A vitamini; 0,05 mg B1 vitamini; 0,06 mg B2 vitamini; 0,4 mg B3 vitamini; 0,032 mg B6 vitamini ve 10 mg C vitamini bulunmaktadır. Besin değerlerinin yanı sıra; kiraz, vücuttaki ürik asit düzeyini düşürerek gut hastalığını iyileştirmek, idrar söktürücü özelliği ile böbreklere faydası için kullanılır. Ayrıca kiraz diş çürümelerini engelleyen bazı maddeleri de içermektedir (Anonim, 2012a).

FAO' nun 2013 yılı istatistik verilerine göre kirazın dünyada toplam üretim alanı 56.635 ha ve toplam meyve üretiminde 2.294.455 ton olarak bildirilmiştir. Türkiye sahip olduğu 96.676 ha kiraz üretim alanı ile dünyada ikinci sırada yer alırken, 494.325 ton üretim miktarı ile birinci sırada yer almaktadır. (Çizelge 1.1.) (Anonim, 2013).

Çizelge 1.1. Dünyada kiraz üreticisi ülkelerin kiraz üretim alanları ve üretim miktarı (Anonim, 2013)

Ülkeler	Üretim alanı (ha)	Üretim miktarı (ton)
Romanya	113684	80.477
Türkiye	96676	494.325
Özbekistan	83333	100.000
ABD	73181	412.873
İran	68965	200.000
Ukreyna	65483	81.200
Şili	55841	90.703
Bulgaristan	50164	37.724
Rusya	48750	78.000
Ukrayna	12500	72.800
Yunanistan	48500	58.200
Almanya	46979	24.462
Polonya	43709	47.552
Yunanistan	9800	44.200
Polonya	11555	37.984
Çin	43536	35.700
İtalya	42894	131.175
Fransa	42812	39.272
İspanya	38505	97.200
Avusturya	36505	41.430
Sırbistan	30264	28.146
Suriye	21117	62.372

Türkiye' nin 2003- 2014 yıllarındaki kiraz alanı ve üretim miktarına bakıldığında yıllara göre bir artışın olduğu gözlemlenmektedir. 2003 yılında 350.000 da' lık bir alanda 265.000 tonluk kiraz üretim miktarı gerçekleştirilirken 2014 yılında kiraz üretim alanı 790,420 da, üretim ise 445.556 tona kadar ulaşmıştır (Çizelge 1.2.) (Anonim, 2014b). Ülkemizin meyve vermeyen ağaç varlığı da göz önünde bulundurulduğunda gelecekte kiraz üretiminin çok daha fazla olması beklenmektedir.

Çizelge 1.2. 2003-2014 yılları arasında Türkiye’ de kiraz üretim alanı ve miktarı
(Anonim, 2014b)

Yıllar	Üretim alanı (da)	Üretim miktarı (ton)
2003	350.000	265.000
2004	376.500	245.000
2005	430.000	280.000
2006	488.604	310.254
2007	555.111	398.141
2008	579.510	338.361
2009	624.585	417.694
2010	670.459	417.905
2011	699.846	438.550
2012	744.138	470.887
2013	764.594	494.325
2014	790.420	445.556

Ülkemizin birçok bölgesinde kiraz yetiştiriciliği yapılmaktadır (Çizelge 1.3.). TÜİK 2014 yılı verilerine göre Ege bölgesi 328.911 da kiraz üretim alanı ve % 42’ lik pay ile birinci sıradadır. Bu sırayı daha sonra Marmara, Akdeniz ve Karadeniz bölgeleri takip etmektedir. Bölgelere göre kiraz üretim miktarlarına bakıldığında, 2014 yılında 155.730 tonluk kiraz üretim miktarı ve % 33.1’ lik Türkiye payı ile Ege bölgesi birinci sırada yer almaktadır. Marmara Bölgesi % 19,7’ lik üretim payı ile ikinci, % 16’ lık üretim payı ile de Akdeniz Bölgesi üçüncü sırada bulunmaktadır (Anonim, 2014c).

Çizelge 1.3. Türkiye’ de Bölgelere göre kiraz üretim alanları ve miktarları
(Anonim, 2014c)

Bölgeler	Üretim alanı (da)	Üretim alanı payı (%)	Üretim miktarı (ton)	Üretim miktarı payı (ton)
Ege	328.911	42	155.730	33.1
Marmara	133.113	17	88.271	19.7
Akdeniz	125.458	16	84.925	15.6
Karadeniz	92.518	15	75.202	15.2
İç Anadolu	27.949	5.1	7.393	11.9
Doğu Anadolu	3.071	2.5	4.084	2.9
Güney Doğu Anadolu	24.530	3.3	6.915	1.8
TOPLAM	735,550		337.595	

Ege Bölgesinde İzmir 118.029 da üretim alanı ve 41.023 tonluk üretim miktarı ile İzmir birinci sırada yer almaktadır. Bu ilimizi 95.737 da alan ve 33.694 ton üretimi ile Manisa takip etmektedir (Çizelge 1.4.) (Anonim, 2014d). Ege Bölgesinin diğer illerinde ise Afyon, Denizli ve Kütahya da kiraz yetiştiriciliğinin yaygın olduğu görülmektedir. Bunun dışında Ege Bölgesinde az da olsa Aydın, Uşak ve Muğla illerinde kiraz yetiştiriciliği yapılmaktadır.

Çizelge 1.4. Ege Bölgesi illerinde kiraz üretim alanı, ağaç sayıları, üretim ve verim miktarları (Anonim, 2014d)

İller	Alan (da)	Meyve veren ağaç sayısı	Meyve vermeyen ağaç sayısı	Toplam ağaç sayısı	Üretim (ton)	Verim (kg)
İzmir	118029	2.975.330	802.226	3.777.556	41.023	14
Manisa	95737	2.062.472	1.198.294	3.260.766	33.694	16
Denizli	37398	660.649	246.380	907.029	19.771	30
Afyon	33333	569.647	139.076	708.723	36.943	65
Kütahya	26128	755.165	181.235	936.400	13.925	18
Aydın	9720	188.762	72.630	261.392	4.512	24
Uşak	5899	80.115	35.186	115.301	2.731	34
Muğla	2667	89.060	14.446	103.506	3.131	35

Kiraz üretimde bazı hastalık ve zararlılar nedeniyle önemli ürün kayıpları meydana gelebilmektedir (Karaca vd., 1972; Gökçe vd., 1998, Spotts vd., 1990). Ağaçların dallarında ya da tümünde meydana gelen kurumalar bu ürün kayıplarının nedenlerinden biridir. Bu kurumalar böcek ve don zararından, aşı uyumsuzluğundan ve hastalıklardan kaynaklanabilmektedir (Karaca vd., 1972; Gökçe vd., 2011).

Dünyada kirazlarda gövde, dal ve sürgünlerde kurumalara yol açan hastalıkların başında *Leucostoma* kanseri (*Cytospora* kanseri) gelmektedir. *Leucostoma* (*Cytospora*) kanseri tek yıllık sürgünlerde genellikle yaprak izleri ve gözlerin etrafında koyulaşmış çökük alanlar şeklinde ortaya çıkar ve geriye doğru ölüm ile tüm sürgünler ölebilmektedir. Kalın dallar da ise enfekteli kabuğun çöküp ve çatlayıp kuruması ile kanser oluşmaktadır. Kanserli kabuk dokusu altında kararmış bölgelerin oluşumu yaygın olarak görülmektedir. Hastalık için tipik olmasa da kanserli bölgede zamk akıntısı meydana gelebilir. Kanser dalı çepeçevre sardığında bu kısmın üstü ölür. Kanserler ana gövde de olduğu durumda ağacın tümü kurutabilmektedir (Biggs, 1989; Ogawa vd., 1995).

Ülkemizin birçok kiraz yetiştirilen bölgesinde olduğu gibi Ege Bölgesinde de kiraz üretiminde karşılaşılan en önemli sorunlardan bir tanesi ağaçlarda meydana gelen kurumalardır. Bu kurumaların nedenlerinden biri, bazı *Leucostoma* türlerinin neden olduğu *Leucostoma* Dal Kanseri hastalığıdır (Gökçe vd., 1998; Çeliker ve Kural, 2007). Ülkemizin farklı bölgelerinde yapılan çalışmalarda çeşitli taş çekirdekli meyve türleri üzerinde *Leucostoma* kanserinin varlığı belirlenmiştir. Doğu Anadolu ve Ege Bölgelerinde yapılan survey çalışmalarında çeşitli taş çekirdekli meyve türleri üzerinde *Leucostoma* kanserinin varlığına rastlanılmıştır (Kural ve Erdiller, 1994; Gökçe vd.,2011; Çeliker ve Kural, 2007). İzmir, Denizli, Uşak, Afyon ve Manisa illerinde ki kiraz alanlarında yapılan çalışmalarda da *Leucostoma* spp.'nin varlığı sıklıkla belirlenmiştir (Yılmaz, 2013).

Michigan eyaletinde şeftali ağaçlarında yapılan çalışmalarda da bazı *L. personii* popülasyonları içerisinde dsRNA içeren izolatlar belirlenmiştir. Ancak hastalığın biyolojik mücadelesinde hipovirulent izolatların kullanımı gerçekleştirilmemiştir (Hammar vd., 1989; Jensen vd., 1995).

Çalış ve Yanar (2015) Tokat kiraz ve vişne bahçelerinde alınan odun dokusu örneklerinden kiraz ve vişnelerde kısa sürede ölümlere neden olan faktörlerden birinin *Leucostoma* spp.'nin yol açtığı Dal Kanseri olabileceğini bildirilmiştir. *Leucostoma* spp. izolatları ile gerçekleştirilen patojenisite testleri *Leucostoma* izolatlarının farklı seviyelerde virulentliğe sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Farklı seviyelerde virülenslik gösteren bu hastalık etmenlerinin avirulent ırkları kullanılarak çapraz korunma ile virulent ırkların kontrol edilebileceğini bu nedenle hipovirulent ırkların araştırılması gerektiğini bildirmişlerdir (Çalış ve Yanar, 2015).

Leucostoma ile ilgili yapılan çalışmalar hem ülkemizde hem de diğer ülkelerde oldukça sınırlı sayıdadır. Ayrıca şeftalide zarar oluşturan *Leucostoma* spp.' da dsRNA saptanmış olmasına karşılık (Hammar vd., 1989; Jensen vd., 1995, Adams vd., 1989) kirazda sorun olan *Leucostoma* spp.' da dsRNA'nın varlığı konusunda herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada Ege Bölgesi illerinde kirazlardan elde edilen *Leucostoma* spp. izolatları misel gelişimi; dal testi, elma testi ve dsRNA içermesi yönünden incelenmiştir. Kiraz ağaçlarından elde edilen *Leucostoma* spp. izolatlarında elma testi ve dsRNA'nın varlığı ilk kez bu çalışmada gerçekleştirilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Leucostoma kanseri ilk olarak Stewart vd. tarafından 1900 New York eyaletinin batı bölgelerinde taş çekirdekli meyve türlerinden şeftali üzerinde saptanmıştır (Biggs, 1989). Bunu takiben Rolfs 1909 yılında ABD-Missouri' de ve 1912' de ise Kanada'da hastalığın yine şeftalilerde zarar yaptığı Gussow tarafından bildirilmiştir (Biggs, 1989).

Leucostoma kanseri, eski adlarıyla Cytospora Kanseri ve Valsa Kanseri olarakta bilinmektedir. Geçmişte hastalığın dünyanın birçok ülkesinde farklı konukçular üzerinde görüldüğü bildirilmiştir (Hayova ve Minter, 1998). Hastalık Kanada ve ABD' nin özellikle kışı soğuk olan bölgelerinde kiraz, nektarin ve şeftalilerde yaygın olarak bulunmaktadır. Aralarında Türkiye'nin de olduğu birçok Avrupa ülkesinde şeftali, kayısı ve kirazlarda hastalığın yaygın olduğu bildirilmiştir (Hayova ve Minter, 1998).

Adams vd., (1989) ABD' de farklı coğrafik bölgelerden şeftaliden izole ettiği *L. personii* ve *L. cinctum* izolatlarının virülenslikleri ve kültürel özelliklerini açısından incelenmiştir. Virülenslik testlerinde şeftalide *L. personii*' nin *L. cinctum*' a göre virülensliğinin daha düşük olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca Leonian's malt ekstakt agar (LMA) ortamında *L. personii*' de koloni gelişiminin loblu ve petriyi tam olarak doldurmadığını, koloni renginin zeytini ve koyu renkte olduğunu, 37° C' de gelişebildiğini ve piknit çapının 1 mm' den küçük olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca *L. cinctum*' da koloni gelişiminin uniform (düzenli) ve pamuksu görüntü oluşturduğu, koloni renginin zeytini ve açık kahverengi olduğu, 37° C' de gelişme gösteremediği, izolatların neredeyse tümünün büyük piknit (1-3 mm) oluşturduğu belirlenmiştir.

Ülkemizde daha önce yapılan çalışmalarda farklı coğrafik bölgelerde kirazlarda iki *Leucostoma* türünün varlığı saptanmıştır. Doğu Anadolu Bölgesinde kiraz ağaçlarında *L. cinctum*' un yayılış oranı Erzincan'da %38,1 ve Gümüşhane'de %13,3 olarak belirlenmiştir (Gökçe vd., 2011). Ege Bölgesinde ise Aydın, Çanakkale, Denizli, İzmir, Muğla ve Uşak illerinde kiraz ve şeftali ağaçlarındaki kanserlerden *L. personii*, erik ağacından ise *L. cinctum* izole edilmiştir (Çeliker ve Kural, 2007). Yılmaz (2013)' in yılında Ege Bölgesinde kiraz ağaçlarından izole edilen izolatların *L. cinctum* olma olasılığını fakat kesin bir tanı olabilmesi için moleküler yöntemlerin kullanılmasının gerektiğini rapor etmiştir.

Hammar vd. (1989)' nin ABD'nin Michigan eyaletinde şeftali ağaçlarında *L. personii* sitoplazmasında dsRNA saptamış ve kültürel özellikleri belirlenmiştir. Buna göre dsRNA içeren izolatların açık renkli olduğu, daha az yoğunlukta misel geliştirdikleri, hif uçlarında erimeler olduğu ve piknit oluşturamadıkları gözlenmiştir. Ayrıca dsRNA içeren iki izolat diğer izolatlar ile karşılaştırıldığında oluşturdukları kanserlerin boyutlarının yarı yarıya azaldığı tespit edilmiştir.

Jensen ve Adams (1995) ABD 'nin Kuzey Carolina eyaletinde şeftali bahçelerinden elde edilmiş NC14.4A kodlu hipovirulent *L. personii* izolatının sitoplazmasından dsRNA' ları izole etmişlerdir. Bu dsRNA' ların 7.9, 3.0, 2.8, 2.6, 2.3 ve 0.7 kb arasında değişen moleküler ağırlıkta olan en az 6 farklı segmentten oluştuğunu tespit etmişlerdir. Bu izolatın kültürde gelişen hif uçlarından elde edilen HT kodlu izolatında ise bu dsRNA segmentlerinden dördünün kaybolduğu ve sadece 7.9 ve 2.3 kb lik olanların kaldığı belirlenmiştir. Bu izolatın kültürde gelişme hızı ve spor oluşturma özelliklerinin virulent izolatlarla aynı olduğu, ancak kanser oluşturmada hipovirulent özelliğini koruduğu aynı araştırmacılar tarafından ortaya konulmuştur.

Adams vd. (1990) ABD' nin Michigan eyaletinde iki farklı şeftali bahçesinden toplanan *L. personii* izolatlarında hipovirülensliğin yayılmasında önemli olan VCG (vejetatif uyum grubu) çeşitliliğini belirlemişlerdir. Çalışmada bir bahçedeki 24 izolat arasında 13 farklı VCG, ikinci bahçede ise 65 izolat arasında 23 farklı VCG bulmuşlardır. Bu sonuçlar *L. personii*' de VCG çeşitliliğinin oldukça yüksek olduğunu ortaya koymuştur.

Peyambari vd. (2014) İran' da şeker kamışından elde edilen *Cytospora sacchari* izolatından moleküler ağırlığı 1.85, 1.65 ve 1.27 kbp olan dsRNA segmentlerini elde etmişlerdir. Bu virüsün genom yapısını incelediklerinde ise *Partitiviridae* familyasına ait olduğunu tespit etmişlerdir. Fakat elde edilen 1.27 kbp olan dsRNA segmentinin moleküler ağırlığının diğerlerinden küçük olması nedeniyle bu dsRNA segmentinin kusurlu olabileceği belirtilmiştir.

Bazı araştırmacılar *Leucostoma* spp. ile ilgili kestane kanserinde olduğu gibi dsRNA üzerinde çalışma yapmış (Adams vd., 1989; Jensen and Adams, 1995) olmasına karşılık hipovirulenslik ve bunun hastalığın mücadelesinde kullanımı üzerinde araştırmaya rastlanmamıştır. Zaten konuyla ilgili 1995 yılından sonra herhangi bir çalışma da bulunmamaktadır. Ülkemiz önemli bir kiraz üreticisi

olduğu için hastalığın biyolojik mücadelesine yönelik kestane kanseri örneğinde olduğu gibi çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Hipovirulenslik kestane kanseri (*Cryphonectria parasitica*)' nin biyolojik mücadelesinde kullanılan en etkili mücadele yöntemlerinden biridir (Anagnostakis, 1982; Milgroom ve Cortesi, 2004).

Hipovirulenslik virulent bir fungusun bazı dsRNA fungal virüsleri ile enfekte olduktan sonra virulensliğinin azalması sonucu ortaya çıkan bir durumdur (Anagnostakis, 1982). dsRNA fungal virüsleri sitoplazmasında bulunduğu hipovirulent bir bireyden anastomosis yolu ile başka bir bireye geçebilmektedir. Ancak anastomosis vejetatif olarak uyumlu olan bireyler arasında gerçekleşmektedir. Birbirleri ile genetik yönden benzer ve anastomosis oluşturabilen bireylerin oluşturduğu gruplara vejetatif uyum grupları (VCGs) adı verilmektedir (Leslie, 1993). Bir fungal populasyonda VCG çeşitliliği ne kadar az ise hipovirulensliğin yayılması o kadar hızlı olmaktadır (Milgroom ve Cortesi, 2004).

Nuss (1992) fungusa transformasyon sistemlerinin geliştirilmesiyle dsRNA' dan tüm uzunlukta cDNA üretebilmiş ve bunu virulent ırklara aktarmıştır. Bu durum virulent ırkların hipovirulent olması ile sonuçlanmış ve ortaya çıkan tüm özellikler hipovirulent ırklarda olduğu gibi yavaş gelişme, soluk renklenme ve azalan sporulasyon olarak gözlenmiştir. Böylece dsRNA hipovirulensliğin nedeni olarak açıkça ortaya konmuştur.

Kestane Kanseri etmeni *C. parasitica*' nın virulensliklerinin belirlenmesinde öncelikle kültürel özelliklerine bakılmaktadır. Milgroom ve Cortesi (2004)' nin belirttiği üzere kültürlerde krem- beyaz gelişen ve az spor veren izolatlar düşük virulensli (hipovirulent) , diğerleri yani kırmızı-turuncu renkte gelişen ve bol spor oluşturan izolatlar virulent olarak kabul edilmiştir. Fakat fenotipik özelliklere bakılarak izolatların virulensliklerini belirlenmesini her zaman doğru olmamaktadır. Nitekim beyaz renkte gelişen *C. parasitica* izolatlarında genellikle dsRNA bulunurken bazı turuncu renkteki izolatlarında dsRNA içerebileceğini belirtilmiştir (Fulbright, 1984; Chung vd., 1994). Bu durumda turuncu gelişen kültürlerin içinde de hipovirulent bulunabileceğini göstermektedir. Van Alfen vd. (1978)' de Bonifacio ve Turchetti' nin kültürde turuncu renk gelişim gösteren İtalyan-hipovirulent izolat bulduklarını bildirmiştir.

Ülkemiz önemli bir kiraz üreticisi olduğu gerçeğinden bakacak olursak, Kestane kanseri örneğinde olduğu gibi kiraz dal kanserinde de biyolojik mücadelenin uygulanabilmesi akılcı bir yaklaşım olacaktır. Bunun için öncelikle bu araştırmanın konusu olan *Leucostoma* spp. izolatlarının dsRNA varlığı yönünden incelenmiş olması gerekmektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma Eylül 2013- Şubat 2015 yılları arasında Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Viroloji Laboratuvarı ve Adnan Menderes Üniversitesi TARBIYOMER Araştırma Laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1. Materyal

Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümünde danışmanı Doç. Dr. Ömer ERİNCİK olan Ethem YILMAZ' ın 'Ege Bölgesinde Kirazlardan Elde Edilen *Leucostoma* Türlerine Ait İzolatların Kültürel ve Patojenik Özelliklerinin Belirlenmesi' konulu tamamlamış olduğu Yüksek Lisans tez çalışmasında kullanılan izolat 100 izolat setinden seçilerek çalışmanın ana materyalini oluşturmuştur. Kullanılan izolatlar İzmir, Manisa, Afyon, Denizli ve Aydın illerini temsil edecek şekilde alınmıştır (Yılmaz, 2013).

Bir yaşında Napolyon (0900 Ziraat) çeşidine ait sürgünler ve Elma (Granny Smith) virülenslik testinde kullanılmıştır. Virülenslik testlerinden sonra seçilen *Leucostoma* spp. izolatları dsRNA analizi kullanılarak yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak kestane kanserinde hipovirulent olduğunu bildiğimiz USA-2 (CHV1) izolatı kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak yapılan 100 *Leucostoma* izolatı içerisinde virülensliği yüksek olan Ki- 778 pik. izolatı kullanılmıştır.

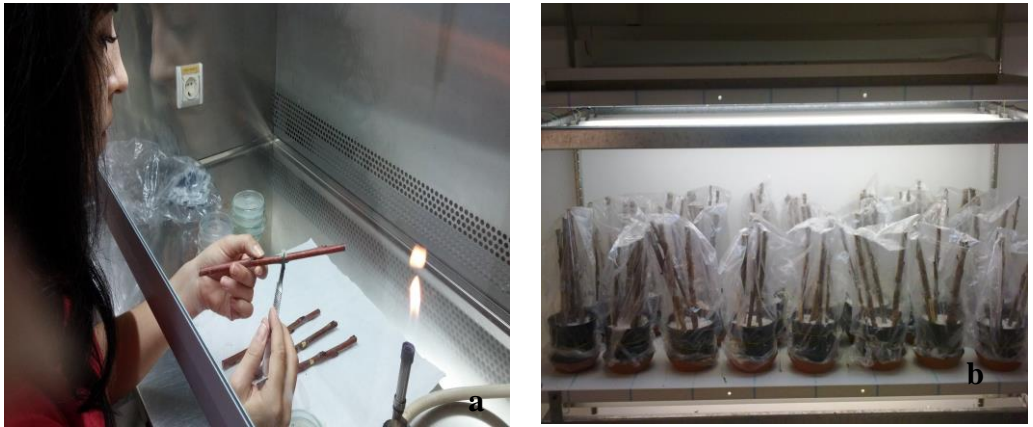
3.2. Yöntem

3.2.1. Virülenslik Testleri

3.2.1.1. Kesik dal testi

İzolatların virülenslik testleri kesilmiş dal testi yöntemi ile yapılmıştır. (Scorza ve Pusey, 1984). Bu test için Denizli-Honaz' dan alınan '0900 Ziraat' (Napolyon) kiraz çeşidinden kesilmiş 20 cm boyunda ve 1-1,5 cm çapında homojen görümlü bir yıllık dallar kullanılmıştır. Her bir izolat için dört dal ve her dal bir tekerrür olarak kabul edilmiştir. Yüzey dezenfeksiyonu için % 1' lik sodyum hipoklorit içerisinde 1,5 dakika bekletilen dallar 1 dakika steril saf su içerisinde durulandıktan sonra steril kurutma kağıtları arasında kurumaları sağlanmıştır. Daha sonra her bir dalın uç kısmının 10 cm aşağısından olacak şekilde, kabuk dokusundan mantar delici ile 5 mm çapında bir disk ile yara açılmıştır. Yaranın

üzeri şerit parafilm ile sarılmış ve sonrasında dallar 3 gün + 4° C' de bekletilmiştir. Bu süre sonrasında şerit parafilm kaldırılmış ve yara bölgesine, PDA' da geliştirilen 5 günlük izolat kültürlerinden alınan genç miselyal alta gelecek şekilde yerleştirilerek üzeri şerit parafilm ile tekrar sarılarak kapatılmıştır. Kontrol dallarına sadece steril agarlı disk yerleştirilmiştir. Daha sonra dallar, içerisinde nemli perlit bulunan 0,5 lt' lik saksılara, çelik köklendirme yönteminde olduğu gibi batırılmış ve üzerine nemlendirilmiş şeffaf plastik torba geçirilerek iklim odasına yerleştirilmiştir (Şekil 3.1.). İklim odasının koşulları 24° C sıcaklığa ve 14 saat aydınlık ve 10 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmıştır. İnokulasyondan 15 gün sonra saksıların üzerindeki plastik poşetler kaldırılmış ve inkübasyona iki hafta daha devam edilmiştir. Sürenin sonunda dallar kanser oluşumu yönünden değerlendirilmiştir. Değerlendirmelerde inokulasyon yeri ve kanserli alanın kabuk dokusu bistüri ile kazındıktan sonra kararın bölgenin boyuna uzunluğu cetvel ile ölçülmüştür. İzolatların oluşturdukları kanser boyutları göz önünde bulundurularak izolatlar birbirleri ile karşılaştırılıp saldırganlık dereceleri ortaya konmuştur.



Şekil 3.1. *Leucostoma* spp. izolatlarının kesilmiş kiraz dalları üzerindeki virülenslik testleri; a) Dallara yara açma işlemi b) İnokule edilen dalların iklim odasında inkübasyonu

3.2.1.2. Elma meyvesi üzerinde virülenslik testi

İzolatlar Granny Smith elma meyveleri üzerinde virülenslik testine tabi tutulmuştur (Hammar vd., 1989). Bunun için homojen büyüklükte ve olgunlukta olan elma meyveleri seçilerek yıkanmış ve %70' lik alkol ile yüzey dezenfeksiyonu yapılmıştır. Daha sonra her iki meyve üzerinden mantar delici ile 6 mm çapında 4 mm derinliğinde 3 tane disk çıkartılmıştır. Denemede her izolat için iki elma kullanılmıştır. İzolatların 5 günlük kültürlerinden 4 mm' lik miselyal diskler açılan iki deliğin içerisine, 3. deliğin içerisine de virulent olduğunu bildiğimiz USA-2 izolatı yerleştirilmiştir. Kontrol için kullanılan elmalara sadece steril agar diski konulmuştur. İnokule edilen bölgelerin kurummasını engellemek için elmalar tek tek plastik poşet içerisine yerleştirilip, ağzı kapatılmıştır. İklim odasında karanlıkta 10 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.2.). Ölçümler 5. gün ve 10. gün olmak üzere iki defa yapılmıştır. İnkübasyondan sonra meyve üzerinde oluşan lezyonların çapı ölçülmek suretiyle değerlendirme yapılmıştır.

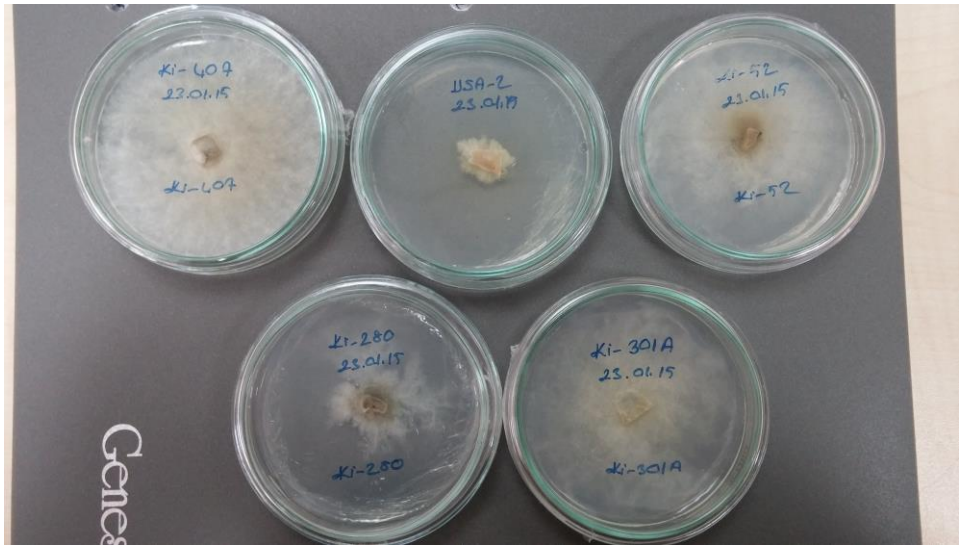
Elma testinde lezyon çap ve dal testinde lezyon uzunlukları ölçüm sonuçları SPSS analizine tabi tutulmuştur. Bu analiz sonucunda virülensliği düşük ve orta olan 4 gruptan 21 adet, virülensliği yüksek 1 gruptan 5 adet olmak üzere toplam 26 izolat dsRNA analizi için seçilmiştir.



Şekil 3.2. *Leucostoma* spp. izolatlarının elma üzerindeki virülenslik testleri; a) *Leucostoma* izolatının elma üzerindeki yara içerisine yerleştirilmesi b) İnokule edilen elmaların iklim odasında inkübasyonu

3.2.1.3. dsRNA analizi

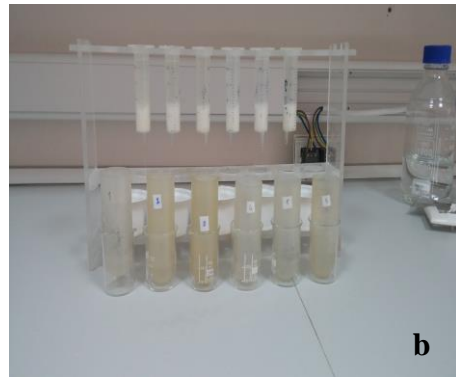
Dal ve elma testi sonuçlarının değerlendirilmesine göre seçilen 26 izolat dsRNA içerip içermedikleri yönünden incelenmiştir. İzolatlar PDA üzerinde 4 gün geliştirildikten sonra selefondisklere yerleştirilmiş ve 7 gün boyunca 24 °C’de inkubatör içerisinde bekletilmiştir (3.3.).



Şekil 3.3. PDA üzerinde gelişen 4 günlük *Leucostoma* spp. izolatları

dsRNA izolasyonu *C. parasitica* için uygulanan yöntemeye göre yapılmıştır (Morris, ve Dods, 1979; Robins ve Griffin, 1997; Valverde, 1990). Analize başlamadan önce selefondiskte 7 gün gelişmiş olan miselyal steril aliminyum folyo içerisinde 1-10 gr alınarak -20 °C’de bekletilmiştir. -20 °C’den çıkarılan miselyal porselen havan içerisinde toz haline gelene kadar ezilmiştir. Toz halindeki örnek 30 ml ağzı kapaklı tüplere yerleştirilerek üzerine 10 ml 2 x STE + 0.5 ml % 10’luk SDS + 11 ml fenol-8 hidrosiquinolin + 5 ml kloroform: isoamilalkol (24:1) ilave edilmiştir. Daha sonra tüpler shaker’da 160 devirde 30 dakika buz içerisinde tutulmuştur. Örnekler 8000 g’de 30 dakika +4 °C’de santrifüj edilmiş ve üst faz steril 50 ml’lik tüplere aktarılmıştır. Daha sonra bu örnekler 20 ml olacak şekilde 1x STE (100 mM NaCl, 50 mM Tris, 1 mM EDTA) ile tamamlanarak ve 4 ml etanol ilave edilip bir gece +4 °C’de bekletilmiştir. dsRNA’nın bitkiye ait RNA ve DNA’dan ayrılacağı CF-11 selüloz kolon kromatografisi hazırlanmış ve örnekler kolonlara aktarıldıktan sonra %17 etanol içeren 80 ml 1X STE tampon solüsyon ile yıkanmış son damlaya kadar bitmesi beklenmiştir. Daha sonra 12 ml STE ilave edilmiş altta

biriken süspansiyon tüplere toplanana kadar beklenmiştir. Bu işlemten sonra tüpler içerisine 18 ml etanol ilave edilerek $-37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de bir gece bekletilmiştir (Şekil 3.3.). Ertesi gün örnekler $-37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' den çıkartıldıktan sonra $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de 8000 g devirde 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra sıvı kısım boşaltılmış dipte kalan peletin kuruması için tüpler ters çevrilmiştir. Tüpler kuruduktan sonra 200 μL 1X TE (50 mM Tris, 1 mM EDTA) ile resüspanse edilmiş ve steril ependorf tüpe mikropipet yardımıyla aktarılmıştır. Daha sonra örnekler 1 μL DNase ve 1 μL MgCl_2 ilave edilerek DNA' dan tamamıyla arındırılması sağlanmıştır. Daha sonra tüplere 900 μL etanol ilave edilerek $-37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de 1 gece bekletilmiştir. Ertesi gün örnekler dondurucudan çıkarıldıktan sonra $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de 8000 g' de 40 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpteki sıvı boşaltılıp, tüpler kuruması için ters çevrilmiştir. Tüpler kuruduktan sonra 1X TBE (90 mM Tris, 90 mM Borik Asit, 1 mM EDTA) ilave edilip resüspanse edilmiştir. Bu işlemten sonra tüplere kısa bir spin yaptırılmıştır. Tüpteki sıvı mikropipet yardımıyla alınarak steril ependorf tüplere aktarılmıştır. Örnekler aktarıldıktan sonra 900 μL ve 30 μL sodyum asit ilave edilerek $-37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de bir gece bekletilmiştir. Dondurucudan çıkarılan örnekler $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de 5000 g' de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından sıvı boşaltılmış ve tüpler kuruyana kadar bekletilmiştir. Tüpler kuruduktan sonra 20 μL steril su ile resüspanse edilmiştir. Daha sonra her bir tüpe 10 μL BPB ilave edilmiştir. dsRNA lar %0.7' lik agarozda 60 V' da 2.5 saat 1X TBE tampon solüsyonda elektroforezde analiz edilmiştir. Moleküler ağırlık standardı olarak Hind III ile kesilmiş DNA kullanılmıştır. Jelin UV ışık altında görüntüsü alınmıştır.



Şekil 3.4. *Leucostoma* spp. izolatlarının dsRNA analizi a) Fungus miselyalinin ezildikten sonra tüplere yerleştirilmesi b) CF II cellulose kolon kromatografisi

3.2.1.4. Total RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonunda Qiagen Plant Mini dsRNA Extraction kiti kullanılmıştır (Fossiac vd., 2001). Bu kitin kullanımındaki aşamalar aşağıda verilmiştir.

1. Kuru ağırlığı yaklaşık 80 mg civarında selefona üzerinde gelişen miselyum 2.0 ml' lik steril mikrosantrifüj tüpleri içerisine yerleştirilmiştir. Miselyum tüplere içerisine yerleştirilmeden önce 1 gün boyunca -80 °C' de bekletilmiştir.
2. Ezilme işleminden sonra tüp içerisine 450 µL RLC buffer ilave edilmiş ve resüspanse edilmiştir.
3. Tüp kuvveti bir şekilde vortexlendikten sonra 3 dakika 56 °C' de inkübe edilmiştir.
4. Lizat 2 ml' lik lila Qiashredder kolonu içerisine döküldü ve 2 dakika 15000 rpm' de santrifüj edildi.
5. Tüpün dibinde oluşan pelet bozulmadan supernatant kısım dikkatli bir şekilde yeni bir tüpe aktarılmıştır.
6. Lizata 200 µL 0.5 M %96-%100 EtOH ilave edilerek pipet yardımı ile karıştırılmıştır.
7. Örnek çökelti meydana gelmeden 2 ml' lik toplama içerisine yerleştirilerek pink RNeasy spin kolon tüpüne aktarılmıştır. Yavaş bir şekilde kolonun kapağı kapatılıp minimum 10,000 rpm' de 22 saniye santrifüj yapılmıştır.
8. Santrifüj bittikten sonra süpernatant kısım dökülmüştür.
9. Kolon üzerine 700 µL RW1 Buffer ilave edilmiştir. Yavaş bir şekilde kolonun kapağı kapatılıp minimum 10,000 rpm' de 22 saniye santrifüj yapılmıştır.
10. Sıvı kısım dökülmüş ve toplama tüpü yeniden kullanılmıştır.
11. Kolon içine 500 µL Buffer RPE koyulmuştur. Kapak yavaşça kapatılıp, minimum 10,000 rpm' de 22 saniye santrifüj yapılmıştır. Sıvı kısım boşaltılıp, tüpler tekrar kullanılmıştır.

12. Kolon içine 500 μ L Buffer RPE ilave edilmiş ve 10, 000 rpm' de 2 dakika santrifüj yaptırılmıştır. Sıvı kısım dökülüp, tüpler atılmıştır.

13. RNeasy kolon yeni olan 2 ml' lik toplama içerisine yerleştirildikten sonra 1 dakika boyunca 10,000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

14. RNeasy kolon 1,5 ml' lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildikten sonra 30- 50 (ideal olan 40) μ L RNase free water doğrudan döndürerek kolon membranına eklenmiştir. Kapak kapatıldıktan sonra 1 dakika 10,00 rpm' de santrifüj edilmiştir.

15. Yeni bir 1,5 ml mikrosantrifüj tüp kullanılarak 14. basamak tekrar edilmiştir.

16. 15. Adımda elde edilen örnek miktarı içerisindeki RNA %15-30 oranında azalma olmaktadır (Şekil 3.4.).



Şekil 3.5. *Leucostoma* spp. izolatlarının total RNA izolasyonu aşamaları
a) Miropipet ile örneklerin epondorfa aktarımı c) Örneklerin elektroforeze yükleme işlemi

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Virülenslik Testleri

4.1.1. Kesik Dal Testi

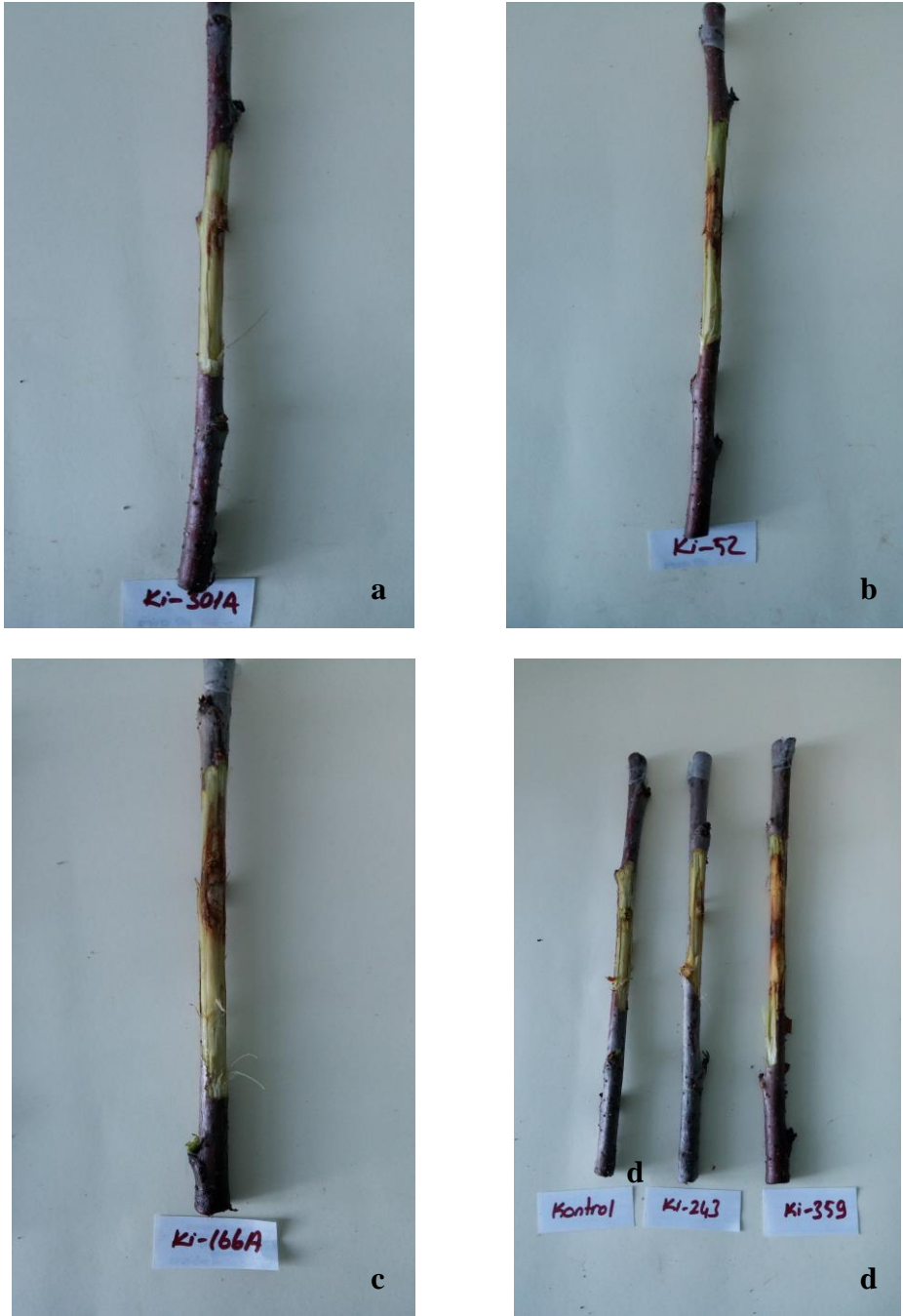
Napolyon kiraz çeşidi üzerine keşilmiş dal yöntemi ile yapılan virülenslik testleri sonucunda, test edilen 100 izolatın virülenslik dereceleri belirlenmiştir. İklim odasında 24 °C ve 30 günlük inkubasyonun ardından, inoküle edilen dalların kabuk dokusunda ortalama 1 ile 14 cm arasında değişen lezyonlar meydana gelmiştir. Bunun dışında lezyon gelişmeyen dallarda gözlemlenmiştir. Hiç lezyon geliştirmeyen 3 izolat ve lezyon büyüklük ortalamaları 6 cm ve altında olan 13 izolat virülenslikleri yönünden düşük olarak kabul edilmiştir. Oluşturdukları lezyon büyüklükleri yönünden 84 izolattan 14 tanesi 7- 10 cm aralığında yer almışlar ve bunların virülenslikleri orta derece olarak değerlendirilmiştir. Geriye kalan 11- 14 cm aralığında ki 70 izolat ise oluşturdukları lezyon büyüklükleri yönünden yüksek virülens olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.1.). Kontrol grubunda herhangi bir lezyon belirtisi gözlemlenmemiştir (Çizelge 4.1.). Dallarda gözlenen lezyon uzunlukları SPSS analizine tabi tutulmuş ve analiz sonuçları Çizelge 4.2.' de verilmiştir. Çizelge 4.2.' de görüldüğü gibi izolatlar istatistiki olarak birbirinden farklı altı grup oluşturmuştur.

Çizelge 4.1. *Leucostoma* spp. izolatlarının ‘Napolyon’ kiraz çeşidi dalları üzerinde oluşturdukları lezyon büyüklüklerine göre gruplandırılması

Lezyon çapı aralığı (cm)	İzolat sayısı	İzolatlar
Gelişme olmayanlar	3	Ki-301A, Ki-194, Ki-343
1-6 cm (düşük virülenslik)	13	Ki-220B, Ki-60, Ki-222A, Ki-166B, Ki-477, Ki-335, Ki-52, Ki-376, Ki-280, Ki-407, Ki-359, Ki-166A, Ki-253
7-10 cm (orta virülenslik)	14	Ki-238, Ki-110B, Ki-463, Ki-90, Ki-150, Ki-164, Ki-440, Ki-384, Ki-411, Ki-435, Ki-173, Ki-487, Ki-220A, Ki-429
11-14 cm (yüksek virülenslik)	70	Ki-778 pik., Ki-249, Ki-199, Ki-461, Ki-241, Ki-283, Ki-425, Ki-266, Ki-460, Ki-236, Ki-460, Ki-236, Ki-134, Ki-134B, Ki-497, Ki-137, Ki-500, Ki-786, Ki-422, Ki-263, Ki-342, Ki-270, Ki-374, Ki-400, Ki-480, Ki-8, Ki-456, Ki-415, Ki-189B, Ki-447, Ki-85, Ki-205, Ki-39, Ki-275, Ki-338, Ki-157, Ki-492, Ki-250, Ki-112, Ki-279, Ki-229, Ki-394, Ki-360, Ki-777, Ki-358, Ki-16, Ki-374a, Ki-213, Ki-476, Ki-457, Ki-93B, Ki-78, Ki-451, Ki-159, Ki-325, Ki-475, Ki-431, Ki-125, Ki-219, Ki-398, Ki-2, Ki-271, Ki-87, Ki-471, Ki-493, Ki-237, Ki-165, Ki-251, Ki-121, Ki-445, Ki-427, Ki-239

Çizelge 4.2. Kesilmiş dal testinde SPSS analizine göre seçilen dsRNA izolatlarının gruplandırılması

Grup	İzolatlar
A Grubu	Ki-301A, Ki-194, Ki-343
AB Grubu	Ki- 60
ABC Grubu	Ki-376
ABCD Grubu	Ki-280
ABCDE Grubu	Ki-166B, Ki-407, Ki-166A, Ki-52, Ki-253
BCDE Grubu	Ki-335, Ki-359, Ki-220A, Ki-222A, Ki-477, Ki-90



Şekil 4.1. *Leucostoma* spp. izolatlarının 'Napolyon' kiraz çeşidinde oluşturdukları lezyonlar a) Lezyon gelişimi olmayan (Ki-301A) b) Düşük virülenslik reaksiyonu (Ki-52) c) Orta virülenslik reaksiyonu (Ki-166A) d) Yüksek virülenslik reaksiyonu (Ki-359)

Yapılan dal testinin sonucunda 3 izolat (Ki-301A, Ki-194, Ki-343) hiç lezyon göstermemiş olmasına rağmen Yılmaz (2013)' in aynı izolatları kullanarak yaptığı çalışmada test edilen *Leucostoma* spp. izolatlarının hepsinin kirazda patojen olduğunu bildirilmiştir. Yapılan bu iki çalışmada da patojenlerin virülenslikleri aralarında farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Ayrıca aynı çalışmada kesik dal testi uygulaması yapılan erik, şeftali, kayısı, badem çeşitlerinin *Leucostoma* spp.'a duyarlı olduğu bildirilmiştir. Erincik (2006) *C. parasitica*' da yapmış oldukları dal testinde de kestane tiplerinde oluşan nekrotik lezyonların çapları arasında istatistiksel açıdan önemli farkların olduğunu bildirilmiştir.

4.1.2. Elma Testi

Leucostoma spp.' den elde edilen 100 izolatın patojenite açısından elma meyvelerinde oluşturdukları lezyonların büyüklüklerini değerlendirmek üzere yapılan inokulasyonlar sonucu meyvelerde çeşitli boyutlarda yuvarlak, kahverengi, yumuşak ve hafif çökük lezyonların olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. *Leucostoma* spp. izolatlarının Granny Smith elma çeşidinin meyveler üzerinde oluşturdukları farklı boyutlardaki lezyonlar

İnokülasyondan beş gün ve on gün sonra olmak üzere iki kez lezyon çapı ölçümü yapılmıştır. Beşinci gün yapılan ölçümlerde ortalama lezyon çaplarının 1,2-2 cm arasında olduğu ve bazı meyvelerde lezyonların görülmediği gözlemlenmiştir. 10. gün yapılan ölçümlerde ise ortalama lezyon çaplarının 1,6- 3,8 cm arasında olduğu ve 5. gün ölçümlerinde lezyon görülmeyen izolatların 10. günde de lezyon göstermediği gözlemlenmiştir (Çizelge 4.3., Çizelge 4.4.). Lezyon çaplarına göre elde edilen sonuçlar SPSS analizine tabi tutulmuş ve sonuçlar Çizelge 4.5.' de verilmiştir. Çizelge 4.5.' de görüldüğü gibi izolatlar istatistiki olarak birbirinden farklı altı grup oluşturmuştur.

Çizelge 4.3. *Leucostoma* spp. izolatlarının elma üzerinde 5. günde oluşturdukları lezyon büyüklüklerine göre gruplandırılması

Lezyon Çapı Aralığı (mm)	İzolat Sayısı	İzolatlar
Gelişme olmayanlar	6	Ki-301A, Ki-343, Ki-60, Ki-376, Ki-173, Ki-87
1-2 cm (düşük virülenslik)	26	Ki-778 pik., Ki-249, Ki-199, Ki-241, Ki-283, Ki-236, Ki-137, Ki-90, Ki-335, Ki-359, Ki-374a, Ki-325, Ki-159, Ki-451, Ki-125, Ki-219, Ki-398, Ki-2, Ki-271, Ki-237, Ki-165, Ki-220A, Ki-112, Ki-487, Ki-427, Ki-239
2,5-5 cm (orta virülenslik)	68	Ki-238, Ki-110B, Ki-463, Ki-150, Ki-164, Ki-440, Ki-384, Ki-411, Ki-435, Ki-429, Ki-220B, Ki-222A, Ki-166B, Ki-477, Ki-52, Ki-280, Ki-407, Ki-166A, Ki-253, Ki-461, Ki-241, Ki-283, Ki-425, Ki-266, Ki-460, Ki-460, Ki-236, Ki-134, Ki-134B, Ki-497, Ki-500, Ki-786, Ki-422, Ki-263, Ki-342, Ki-270, Ki-374, Ki-400, Ki-480, Ki-8, Ki-456, Ki-415, Ki-189B, Ki-447, Ki-85, Ki-205, Ki-39, Ki-275, Ki-338, Ki-157, Ki-492, Ki-250, Ki-279, Ki-229, Ki-394, Ki-360, Ki-777, Ki-358, Ki-16, Ki-213, Ki-476, Ki-457, Ki-93B, Ki-78, Ki-475, Ki-431, Ki-471, Ki-493, Ki-251, Ki-121, Ki-445, Ki-194

Çizelge 4.4. *Leucostoma* spp. izolatlarının elma üzerinde 10. günde oluşturdukları lezyon büyüklüklerine göre gruplanması

Lezyon Çapı Aralığı (cm)	İzolat Sayısı	İzolatlar
Gelişme olmayanlar	6	Ki-173, Ki-87, Ki-376, Ki-301A, Ki-60, Ki-343
1,6-3,8 cm (orta virülenslik)	9	Ki-360, Ki-407, Ki-280, Ki-422, Ki-137, Ki-110B, Ki-134, Ki-199
4< cm (yüksek virülenslik)	90	Ki-238, Ki-463, Ki-150, Ki-164, Ki-440, Ki-384, Ki-411, Ki-435, Ki-429, Ki-220B, Ki-222A, Ki-166B, Ki-477, Ki-52, Ki-166A, Ki-253, Ki-461, Ki-241, Ki-283, Ki-425, Ki-266, Ki-460, Ki-236, Ki-134B, Ki-497, Ki-500, Ki-786, Ki-263, Ki-342, Ki-270, Ki-374, Ki-400, Ki-480, Ki-8, Ki-456, Ki-415, Ki-189B, Ki-447, Ki-85, Ki-205, Ki-39, Ki-275, Ki-338, Ki-157, Ki-492, Ki-250, Ki-279, Ki-229, Ki-394, Ki-777, Ki-358, Ki-16, Ki-213, Ki-476, Ki-457, Ki-93B, Ki-78, Ki-475, Ki-431, Ki-471, Ki-493, Ki-251, Ki-121, Ki-445, Ki-194, Ki-778 pik., Ki-249, Ki-241, Ki-283, Ki-236, Ki-90, Ki-335, Ki-359, Ki-374a, Ki-325, Ki-159, Ki-451, Ki-125, Ki-219, Ki-398, Ki-2, Ki-271, Ki-237, Ki-165, Ki-220A, Ki-112, Ki-487, Ki-427, Ki-239

Çizelge 4.5. Elma testinde SPSS analizine göre seçilen dsRNA izolatlarının gruplandırılması

Grup	İzolatlar
A Grubu	Ki-343, Ki-60, Ki-301A, Ki-376, Ki-87, Ki-173
B Grubu	Ki-241
BC Grubu	Ki-199
BCD Grubu	Ki-271, Ki-125, Ki-394, Ki-219, Ki-220A, Ki-239
BCDE Grubu	Ki-451
BCDEF Grubu	Ki-778 pik., Ki-236

Bu çalışmada ilk defa *Leucostoma* spp. ile elma testi yapılmış olduğu için elde edilen sonuçlar *C. parasitica*' da uygulanan elma testi ile karşılaştırılmıştır.

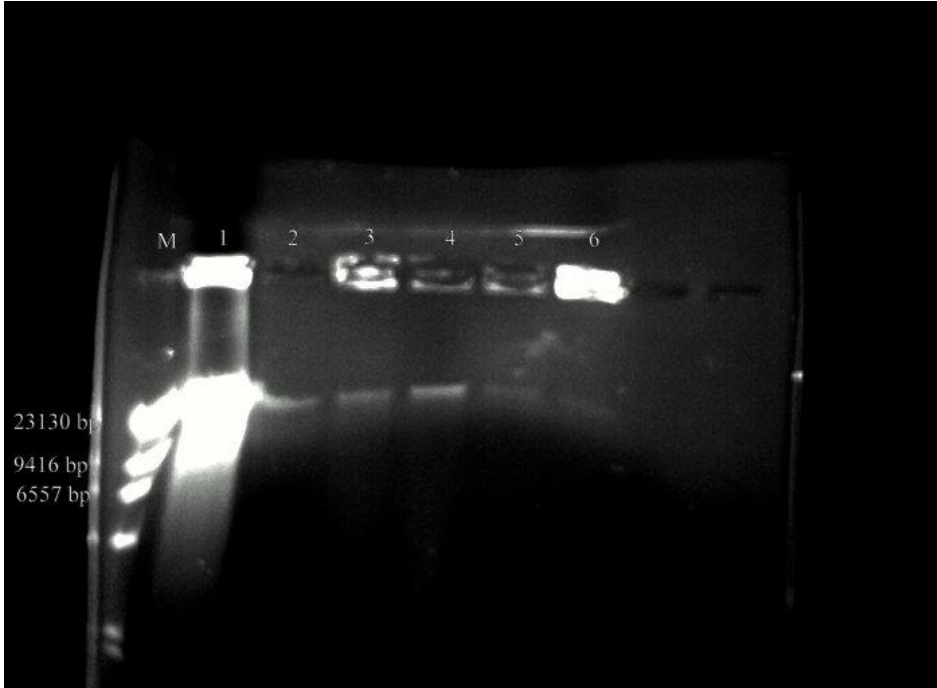
Elma testinde *Leucostoma* spp. izolatlarının elma üzerinde oluşturduğu lezyonların çapları düşük virülenslik gösteren izolatlarda birbirine yaklaşık iken yüksek ve orta virülenslik gösteren izolatlarda çaplar birbirinden farklılık göstermiştir. Bisiach vd. (1988) elma testinde *C. parasitica*'nın virüent ve hipovirüent izolatlarının oluşturduğu lezyonların büyüklüklerinin yaklaşık olması nedeniyle güvenilir olmadığını ileri sürerken, Elliston (1985) ve De Lange vd. (1998) elma testi sonuçlarında lezyon çaplarının birbirinden farklı olduğunu bularak virüent ve hipovirüent izolatların bu yöntemle kolaylıkla ayrılabilceğini ve ayrıca izolatların virülensliklerinin kısa sürede ölçülebileceğini belirtmişlerdir. Lee vd. (1992)' da bu test ile sonuçlar kısa sürede alınsa da doku farklılığı nedeniyle elma testi sonuçlarının kestenede yapılacak test sonuçlarını yansıtmayacağını, izolatların virülensliklerinin kestane dokuları üzerinde değerlendirilmesi gerektiğini belirtmiştir.

Elma testinde hiç lezyon belirtisi göstermeyen Ki-301A ve Ki-343 izolatlarının dal testinde de herhangi bir belirti vermediği gözlenmiştir (Çizelge 4.3.). Fulbright (1984)' da kestane kanserinde elma ve dal testinden elde edilen lezyon ölçüm sonuçlarının birbirlerine çok yakın olduğunu bildirmiştir.

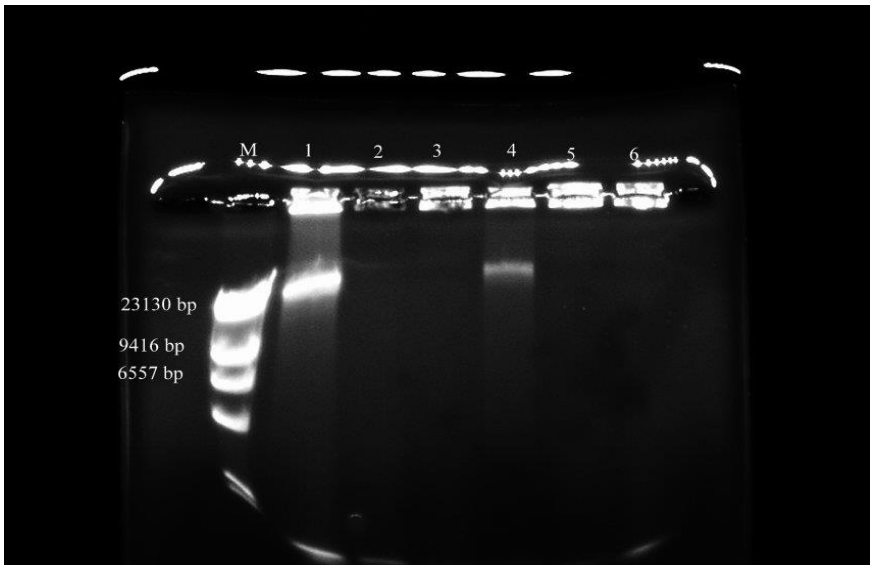
Dal testi ve elma testi testinde lezyon uzunluğu ve lezyon çapına göre belirlenen izolatlar istatistik analiz sonuçlarına göre gruplandırılmıştır. Dal testi SPP analizine sonuçlarına göre A grubundan 3, AB grubundan 1, ABC grubundan 1, ABCD grubundan 1, ABCDE grubundan 3, BCDE grubundan 4 izolat; elma testinin sonuçlarına göre A grubundan 6, B grubundan 1, BC grubundan 1, BCD grubundan 6, BCDE grubundan 1, BCDEF grubundan 2 toplam 26 izolat dsRNA analizinde kullanılmak üzere seçilmiştir. dsRNA analizi için seçilen 26 izolatın 6'sı düşük virülenslik gösteren, 15'i orta derece virülens ve 5'i yüksek virülenslik gösteren gruplardan alınmıştır. Bunun nedeni genellikle funguslarda - virulensi düşük olan izolatta da dsRNA bulunabileceği gibi virulent olan izolatlarda da bulunabilme ihtimalini araştırmak içindir.

4.1.3. dsRNA Analizi

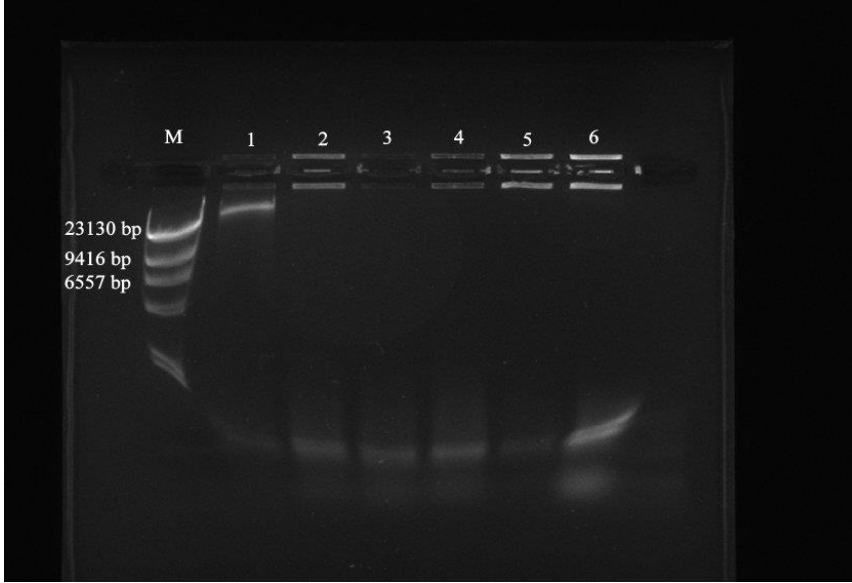
Düşük ve yüksek virülenslik gösteren 26 izolatın üç tekrarlı olarak dsRNA analizi yapılmıştır. Sadece 6 izolatta dsRNA profili belirlenmiş fakat ikinci yinelemede bu izolatlardan sadece 3 tanesinde dsRNA profili görülmüştür. Bunun üzerine üçüncü tekrarda ise daha önce dsRNA profili belirlenen izolatların hiçbirinde dsRNA profiline rastlanmamıştır (Şekil 4.3., Şekil 4.4., Şekil 4.5). Pozitif kontrol olan USA-2 (CHV1, 12 kb) izolatının moleküler ağırlığı ile dsRNA profili görülen 6 izolatın moleküler ağırlığının birbirine yakın olduğu gözlemlenmiştir. dsRNA profili gördüğümüz 6 *Leucostoma* spp. izolatlarının İzmir (Ki-394, Ki-280, Ki-301A, Ki-407), Manisa (Ki-376) ve Denizli (Ki-52) illerinden elde edilen izolatlar olduğu belirlenmiştir. Nitekim Márquez vd. (2007) *Curvularia protuberata* etmeninde bulunan dsRNA' ların kuruma ya da çözdürüp dondurulmaktan etkilendiğini ve bu işlemlerden sonra dsRNA' ların elemine edildiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da dsRNA bantlarının görüldüğü aynı izolatlar ile yapılan tekerrürlü analizler sonucu bantların görülmemesi benzer kuruma ve donma çözüme gibi nedenlerden kaynaklanabileceği düşünülebilir.



Şekil 4.3. *Leucostoma* spp. izolatlarından elde edilen dsRNA' ların agar jel elektroforez görüntüsü; Marker (M), USA-2 (1), Ki-394 (2), Ki-376 (3), Ki-280 (4), Ki-407 (5), Ki-301A (6)



Şekil 4.4. *Leucostoma* spp. izolatlarından elde edilen dsRNA' ların agar jel elektroforez görüntüsü; Marker (M), USA-2 (1), Ki-778 pik. (2), Ki-451 (3), Ki-52 (4), Ki-236 (5), Ki-271 (6)



Şekil 4.5. *Leucostoma* spp. izolatlarından elde edilen dsRNA' ların agar jel elektroforez görüntüsü; Marker (M), USA-2 (1), Ki-778 pik. (2), Ki-199 (3), Ki-125 (4), Ki-220A (5), Ki-239 (6)

dsRNA analiz sonuçlarına göre bulunan 6 dsRNA profili USA-2 (CHV1, 12 kb) dsRNA profili ile aynı moleküler ağırlıkta olduğu görülmüştür. Jensen and Adams (1995) ABD' nin Kuzey Carolina eyaletinde şeftali bahçelerinden elde edilmiş NC14.4A kodlu hipovirulent *L. personii* izolatının sitoplazmasından dsRNA' ları izole etmişlerdir. Bu dsRNAların 7.9, 3.0, 2.8, 2.6, 2.3 ve 0.7 kb arasında değişen moleküler ağırlıkta olduğunu ve en az 6 farklı segmentten oluştuğunu tespit etmişlerdir. Bu izolatın kültürde gelişen hif uçlarından elde edilen HT kodlu izolatında ise bu dsRNA segmentlerinden dördünün kaybolduğu ve sadece 7.9 ve 2.3 kb lik olanların kaldığı belirlenmiştir.

Peyambari vd. (2014) İran’ da şeker kamışından elde edilen *Cytospora sacchari* izolatından moleküler ağırlığı 1.85, 1.65 ve 1.27 kbp olan dsRNA segmentlerini elde etmiştir. Bu virüsün genom yapısını incelediklerinde ise *Partitiviridae* familyasına ait olduğunu tespit etmişlerdir. Fakat elde edilen 1.27 kbp olan dsRNA segmentinin moleküler ağırlığının diğerlerinden küçük olması nedeniyle bu dsRNA segmentinin kusurlu olabileceği belirtilmiştir. Mikovirüsler geniş bir varyasyona sahip olmasına rağmen bu virüslerle ilgili bilgilerin hala yetersiz olduğu ve bazı virüslerin yapılarının istikrarsız olmasına karşın bazı virüslerinde yapılarının dirençli olduğu belirtilmiştir (Peyambari vd., 2014).

Yapılan total RNA izolasyonunda USA-2, Ki-394, Ki-52, Ki-376, Ki-778 pik., Ki-280, Ki-407, Ki-301A, M-16 izolatları kullanılmıştır. Bu analiz sonucunda alınan sonuçların hepsinde bant gözlemlenmiştir (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. *Leucostoma* spp. izolatlarından elde edilen total RNA’ ların elektroforez görüntüsü; Marker (M), USA-2 (1), Ki-778 pik.(2), Ki-301-A (3), Ki-52 (4), Ki-376 (5), Ki-280 (6), Ki-394 (7), Ki-407 (8), M-16 (9), USA-2 (10)

5. SONUÇ

Türkiye kiraz üretiminde Ege Bölgesi ülke ekonomisinde önemli bir yer tutmaktadır. Son yıllarda *Leucostoma* Kanseri Ege Bölgesinde kirazlarda şiddetini önemli derecede arttırmış ve neden olduğu kurumalar ile kiraz üreticilerinin şikayet ettiği hastalık problemlerinden biri haline gelmiştir. Çalışmada Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümünde danışmanı Ömer ERİNCİK olan Ethem YILMAZ' ın 'Ege Bölgesinde Kirazlardan Elde Edilen *Leucostoma* Türlerine Ait İzolatların Kültürel ve Patojenik Özelliklerinin Belirlenmesi' konulu tamamlamış olduğu Yüksek Lisans tez çalışmasında kullanılan izolatlardan 100 izolat kullanılmış ve bu izolatların dal ve elma testleri bittikten sonra seçilen 26 izolata yapılarında dsRNA içerip içermediği araştırılmıştır. Kiraz ağaçlarından elde edilen *Leucostoma* spp. izolatlarında elma testi ve dsRNA' nın varlığının araştırılması ilk kez bu çalışmada ele alınmıştır.

Kiraz ağaçlarından elde edilen toplam 100 *Leucostoma* spp. izolatu patojenik özellikleri yönünden karakterize edilmiştir. İzolatların hepsi kiraz dalları üzerinde yapılan patojenisite testinde değişen virülenslik derecelerinde kanser oluşturmuşlardır. Yapılan elma testi içinde oluşan virülenslik derecelerinde değişkenlik göstermiştir. Bu patojenisite testi sonucunda gruplandırmak için SPSS analizi yapılmıştır. Analiz sonucu oluşan gruplardan virülensliği düşük ve yüksek olan gruplardan 26 izolat seçilip dsRNA analizi yapılmıştır. Analiz üç kez yinelenmiştir. Seçilen 26 izolat içerisinde 6 tane izolatta bant görülmüştür. Bant görülen izolatlar daha sonra tekrar dsRNA analizine tabi tutulduğunda bu bantların görülmediği gözlemlenmiştir.

Birbirini doğrulamayan bu sonuçlar Marquez vd. (2007)' nin fungustan mikovirüsün eliminasyonu için yapılan sonuçları ile açıklanabilir. Bazı virüslerin yapılarının istikrarsız oluşu (Peyambari vd., 2014) onları kuruma ve donma-çözünmeye hassas hale getirebilir. Bu nedenle bu çalışmanın tekrar ele alınması ve daha detaylı çalışılması ve fungusun yapısında bulunan dsRNA profillerini içeren izolatların belirlenmesi halinde etmenin biyolojik mücadelesi için bir olanağın ortaya çıkma ihtimali araştırılabilir. Ancak bundan önce dsRNA' nın etmen üzerindeki etkisi ve genom yapısı araştırılmalıdır. Şayet fungus ve virüs arasında *C. parasitica*' da olduğu gibi bir hipovirülenslik ilişkisi belirlenecek olursa bu çalışma sonucu saptanan dsRNA' lar biyolojik mücadele ajanı olarak anlam kazanabilecektir.

KAYNAKLAR

- Adams, G. C., Hammer, S. A., 1989. Optimum sample size for detecting virulence in *Leucostoma* isolates from peach. **Plant Disease.**, 73: 754-759.
- Adams G. C., Hammar, S. A., Proffer, T. 1990. Vegetative compatibility in *Leucostoma persoonii*. **Phytopathology**, 80: 287-291.
- Anagnostakis, S. L., 1982. Biological control of chestnut blight. **Science**, 215: 466-471.
- Anonim, 2012a. www.gapagro.com.tr. Erişim Tarihi: 10.04.2015
- Anonim, 2013. <http://faostat.fao.org>. Erişim Tarihi 10.04.2015
- Anonim, 2014a. www.tr.wikipedia.org. Erişim Tarihi: 10.04.2015
- Anonim, 2014b. Türkiye İstatistik Kurumu Konularına göre İstatistikler veri tabanı <http://www.tuik.gov.tr>. Erişim Tarihi: 10.04.2015
- Anonim, 2014c. Türkiye İstatistik Kurumu Konularına göre İstatistikler veri tabanı <http://www.tuik.gov.tr>. Erişim Tarihi: 10.04.2015
- Anonim, 2014d. Türkiye İstatistik Kurumu Konularına göre İstatistikler veri tabanı <http://www.tuik.gov.tr>. Erişim Tarihi: 10.04.2015
- Biggs, A. R., 1989. Temporal changes in the infection court after wounding of peach bark and their association with cultivar variation in infection by *Leucostoma persoonii*. **Phytopathology**, 79: 627-630.
- Bisiach, M., A. De Martino, E. Gobbi, M. Intropido and G. Vegetti, 1988. Studies on chestnut blight: activity report. **Rivista di Patologia Vegetale**, S. IV, 24: 3-13.
- Çalış, Ö. ve Yanar, Y., 2015. Tokat Yöresinde Kiraz ve Vişne Ağaçlarında Ölümlere Neden Olan Hastalık Etmenlerinin Belirlenmesi. **Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 32 (2): 32-40.
- Çeliker, N. M. ve Kural, İ., 2007. Ege Bölgesinde Özellikle Kiraz ve Diğer Meyve Ağaçlarında Kurumaya Neden Olan Sitospora Kanseri. **Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri**, Isparta.
- Chung, P., Bedker, P. J. and Hillman, B. I., 1994. Diversity of *Cryphonectria parasitica* hypovirulence associated dsRNA within a chesnut population in New Jersey. **Phytopathology**, 84: 984-990.

- De Lange, W. J., B. D. Wingfield and M. J. Wingfield, 1998. A rapid, apple-based test for virulence in *Cryphonectria cubensis* isolates. **Eur. J. For. Phytopathology**, 28: 409- 412.
- Elliston, J.E., 1985. Characteristics of dsRNA- containing strains of *Endothia parasitica* in relation to hypovirulence. **Phytopathology**, 75: 151-158.
- Erincik, B., 2006 Aydın Kestane Üretim Alanlarından Elde Edilen *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr İzolatlarının Virülensliklerinin ve Bu Yörede Yaygın Olarak Üretilen Kestane Çeşitleri İle Konukçusu Olan Bazı Orman Ağaçlarının Bu Etmene Karşı Reaksiyonlarının Belirlenmesi Üzerine Çalışmalar. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Basılmamış), Aydın.
- Foissac X., Svanella-Dumas, L., Gentit, P., Dulucq, M. J., Candresse, T., 2001. Polyvalent detection of fruit tree Tricho,Capillo and Foveavirus by nested RT-PCR using degeneratedand inosine containing primers (DOP RT-PCR). **Acta Horticulture**, 550: 37-43.
- Fulbright, D. W., 1984. Effect of eliminating dsRNA in hypovirulent *Endothia parasitica*. **Phytopathology**, 74: 722-724.
- Gökçe A. Y., Turak, S., Albayrak, S. ve Akbağ, R., 1998. Doğu Anadolu bölgesinde meyve ağaçlarında sorun olan fungal etmenlerin tespiti. **Bitki Koruma Bülteni 2011**, 51(1): 33-44.
- Gökçe A.Y., Turak, S., Albayrak, S. ve Akbağ, R., 2011. Doğu Anadolu bölgesinde meyve ağaçlarında sorun olan fungal etmenlerin tespiti. **Bitki Koruma Bülteni**, 51:33-44.
- Hammar, S., Fulbright D.W., Adams, G.C. 1989. Association of double-stranded RNA with low virulence in an isolate of *Leucostoma persoonii*. **Phytopathology**, 79: 568-572.
- Hammer, S. A. and lezzoni, A., 1989. Optimum sample size for detecting virulence differences in *Leucostoma* isolates from peach. **Plant Disiase**, 73: 754-759.
- Hayova, V. P. and Minter, D. W., 1998. *Leucostomaniveum*. IMI Descriptions of Fungi and Bacteria (137): Sheet 1362.

- Jensen C. J. P. and Adams G. C., 1995. Nitrogen Metabolism of *Leucostoma persoonii* and *L. cincta* in Virulent and Hypovirulent Isolates. **Mycologia**, 87 (6): 864-875.
- Karaca, İ. Bora, T. ve Özçağiran, R., 1972. Kemalpaşa Bölgesinde kiraz ağaçlarının kuruma sebepleri üzerine araştırmalar. **Türkiye Bilimsel Araştırmalar Kurumu, Tarım Ormancılık Araştırma Grubu Yayınları**, Sayı 13.
- Kural, I. I. ve Erdiller, G., 1994. Kayısıda Cytospora Kanseri (*Leucostoma cincta* (Fr) Hohn)' nin Malatya ve Elazığ Koşullarında Gelişimi ve Bazı Kayısı Çeşitlerinin Duyarlılık Düzeylerinin Belirlenmesi Üzerinde Araştırmalar. **VII. Fitopatoloji Kongresi**, pp. 103-106, Adana.
- Leslie J. F. 1993. Fungal Vegetative Compatibility. **Annu. Rev. Phytopathology**, 31:127-50.
- Lee, J. K., T. A. Tattar, P. M. Berman, M. S. Mount, 1992. A rapid for testing the virulence of *Cryphonectria parasitica* using excised bark and wood of American chestnut. **Phytopathology**, 82: 1454-1456.
- Marquez, L. M., Redman, R. S., Rodrigues, R. J. and Roossinck, M. J., 2007. A virus in a fungus in a plant –three way symbiosis required for thermal tolerance. **Science**, 315: 513-515.
- Milgroom, M.G. Cortesi, P., 2004: Biological control of chestnut blight with hypovirulence: A critical analysis. **Ann. Review Phytopathology**, 42: 311–338.
- Morris, T. J. and Dods, J. A., 1979. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus infected plant and fungal tissue. **Phytopathology**, 69: 854-858.
- Nuss, D. L., 1992. Biological control of chestnut blight: An example of virus-mediated attenuation of fungal pathogenesis. **Microbiological Review**, 561-576.
- Ogawa, J. M., Zehr, E. I., Bird, G. W., Ritchie, D. F., Uriu, K. and Uyemoto, J. K., 1995. **Compendium of Stone Fruit Diseases APS Press**, 978-0-89054-174-6, pp. 28-29.

- Peyambari, M., Habibi, M. K., Fotouhbar, K., Dizadji, A. and Roossinck, M., 2014. Molecular Characterization of a Novel Putative Partitivirus Infecting *Cytospora sacchari*, a Plant Pathogenic Fungus. **Plant Phytopathology**, 30 (2): 151-158.
- Robbins, N. and Griffin, G. J., 1997. Spread of white hypovirulent strains of *Cryphonectria parasitica* on grafted American chestnut trees exhibiting a high level of blight control. **European Journal of Forest Pathology**, 29: 51- 64.
- Rolfs F. M., 1909. A disease of neglected peach trees. **Missouri State Board of Horticulture Annual Report**, 2, 278-283.
- Scorza, R., and Pusey, P. L., 1984. A wound- freezing inoculation technique for evaluating resistance to *Cytospora Leucostoma* in young peach trees. **Phytopathology**, 74: 569-572.
- Spots, R. A., Facteau, T. J., Cervantes, L. A. and Chestnut, N. E., 1990. Incidence and control of *Cytospora* cancer and bacterial cancer in a young sweet cherry orchard in Oregon. **Plant Disease**, 74: 577-580.
- Stewart F. C., Rolfs, F. M. and Hall, F. H., 1900. A Fruit Disease Survey of Western New York in 1900. **New York Agricultural Experiment Station**, 191: 291-331.
- Yılmaz, E., 2013. Ege Bölgesinde Kirazlardan Elde Edilen *Leucostoma* Türlerine Ait İzolatların ve Patojenik Özelliklerinin Belirlenmesi. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Basılmamış), Aydın.
- Van Alfen, N. K., Jaynes, R. A. and Bowman, J. T., 1978. Stability of *Endothia parasitica* hypovirulence in culture. **Phytopathology**, 68: 1075-1079.
- Valverde, R. A., Nameth, S. T. and Jordan, R. L. 1990. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. **Plant Disease**, 74: 255-258.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Melis TÖNGÜŞLÜ

Doğum Yeri ve Tarihi : Antalya / 24.04.1990

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi

Bitki Koruma Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri

Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : Berlin Humboldt University (Staj)- 2011

Özgür Fide- 2012

Karya Tarımsal Danışmanlık-2014

Ecas Belgelendirme Denetim Ltd- halen

İLETİŞİM

E-posta Adresi : melistonguslu@gmail.com

Tarih : 17.08.2015